

Handwritten mark: #2

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 05 FEB 2004	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 59 819.3

**Anmeldetag:** 19. Dezember 2002

**Anmelder/Inhaber:** Siemens Aktiengesellschaft, 80333 München/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur PCR-Amplifikation und Detektion  
von Nucleotidsequenzen

**IPC:** C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 9. Januar 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Handwritten signature

Wallner

**BEST AVAILABLE COPY**

## Beschreibung

Verfahren zur PCR-Amplifikation und Detektion von Nucleotidsequenzen

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur PCR-Amplifikation und Detektion von Nucleotidsequenzen. Ein solches Verfahren dient beispielsweise in der medizinischen Diagnostik dazu, infektiöse Zielsequenzen viraler oder bakterieller DNA aufzu-

10

spüren.

Während einer PCR (Polymerase Chain Reaction) wird die zu untersuchende Probe einer zyklischen Temperaturbehandlung unterzogen, bei der DNA-Fragmente im Wesentlichen mit Hilfe eines Primerpaares und einer Polymerase vervielfältigt werden. Heute stehen für solche Analysen Verfahren zur Verfügung, bei denen die PCR auf einem Microchip durchgeführt wird, der ein Array von als „Gel-Pads“ ausgebildeten Microspots aufweist (WO 01/34842 A2). Um eine fluoreszenzspektroskopische Detek-

15

20

25

tion von Hybridisierungen in den Microspots zu ermöglichen, wird bei den bekannten Verfahren der Analytlösung ein markierter Primer zugesetzt.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein alternatives Verfahren zur Amplifikation und Detektion von Nucleotidsequenzen vorzuschlagen, mit dem ein kontinuierliches Monitoring der PCR und insbesondere eine gleichzeitige Untersuchung mehrerer Zielsequenzen oder mehrerer Mutationen einer Zielsequenz auf einfache Weise möglich ist.

30

Die Aufgabe wird durch die Verfahrensschritte gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

35

Beim der Erfindung wird folgendermaßen vorgegangen:

- a) es wird ein Microchip mit einem Array von mehreren Analysepositionen bildenden Microspots bereit gestellt, welche

jeweils eine hydrophile Reaktionsschicht und eine darin eingebettete Mikroelektrodenanordnung umfassen, wobei diese wenigstens ein immobilisiertes, mit einer zu identifizierenden Zielsequenz eines DNA-Fragments hybridisierbares Oligonucleotid als Sondenmolekül enthält,

- b) eine mehrere Zielsequenzen und PCR-Reagenzien enthaltende Analytlösung wird so auf den Microchip aufgebracht, dass sie das Array vollständig überdeckt,
- c) zur Amplifikation der Zielsequenzen wird das Array einer Thermozyklisierung unterworfen,
- d) Hybridisierungsereignisse an immobilisierten Sondenmolekülen einer Analyseposition werden mit Hilfe der ihr zugeordneten Mikroelektrodenanordnung detektiert.

Vorteilhaft bei diesem Verfahren ist zunächst, dass sich Bindungs- bzw. Hybridisierungs-Ereignisse in einem Microspot ohne Unterbrechung der ablaufenden Reaktionszyklen und mit einem minimalen apparativen Aufwand von Beginn der PCR an detektieren lassen. Da sich in den Microspots voneinander unabhängige Elektrodenanordnungen befinden, ist jede Analyseposition einzeln adressierbar und somit mit einem bestimmten Sondenmolekül bzw. einer gesuchten Zielsequenz korrelierbar. Es kann daher eine Hybridisierung in einer Vielzahl von Microspots auf einfachste Weise gleichzeitig verfolgt werden. Bei optischer Auslesung hingegen wäre ein optisches Erfassungssystem erforderlich, das schon allein wegen der geringen Größe der Spots und deren Anordnung auf engstem Raum technisch aufwendig ist. Der technische Aufwand wird noch vergrößert, wenn Arrays mit einer großen Zahl von Microspots auszulesen sind.

Die in einem Microspot durch Hybridisierung mit immobilisierten Sondenmolekülen festgehaltenen Nucleotidsequenzen verändern aufgrund ihrer elektrischen Teilladungen elektrische Parameter wie beispielsweise den Leitwert innerhalb eines Microspots oder die Impedanz einer Elektrodenanordnung. Bei einem aus DE 196 10 115 C2 bekannten impedanzspektroskopisch

auslesbaren Microchip sind auf einem Träger mehrere interdigitale Elektrodenanordnungen vorhanden, wobei Sondenmoleküle auf den Elektroden und auf den zwischen den Elektroden angeordneten Flächen immobilisiert sind. Problematisch bei dieser Art der Detektion von Bindungsereignissen ist, dass sich die Abmessungen der Elektrodenstrukturen um Größenordnungen von molekularen Dimensionen unterscheiden. Mit noch vertretbarem technischen Aufwand lassen sich Elektroden mit einer Breite von etwa 5-10  $\mu\text{m}$ , mit einem ebensolchen Abstand und mit einer Höhe von etwa 0,1 bis 0,5  $\mu\text{m}$  herstellen. Der impedanzspektroskopisch erfassbare Bereich des elektrischen Feldes einer solchen Elektrodenanordnung erstreckt sich etwa 5 bis 10  $\mu\text{m}$  über die Trägeroberfläche bzw. die von der Elektrodenanordnung aufgespannte Ebene hinaus. Dagegen hat ein beispielsweise 100 Basenpaare aufweisendes Sondenmolekül eine Länge von nur etwa 30 nm. Entsprechend gering ist der Einfluss von Bindungsereignissen in einer auf der Sensorfläche bzw. den Elektroden immobilisierten unimolekularen Schicht von Sondenmolekülen auf das elektrische Feld bzw. auf die Impedanz der Elektrodenanordnung.

Dadurch, dass erfindungsgemäß die Elektrodenanordnung zumindest teilweise in eine Sondenmoleküle enthaltende und für Zielmoleküle durchlässige hydrophile Reaktionsschicht eingebettet ist, kann innerhalb der Reaktionsschicht eine viel größere Anzahl von Sondenmolekülen bzw. Zielsequenzen angesammelt werden als in einer unimolekularen Schicht. Die Folge ist eine weitaus größere Beeinflussung des elektrischen Feldes bzw. des impedanzspektroskopischen Erfassungsbereiches der Elektrodenanordnung. Ein derart ausgestalteter Microchip weist eine entsprechend größere Messempfindlichkeit bzw. Sensitivität auf. Bei herkömmlichen Microchips dagegen würde eine durch PCR erzielte Konzentrationserhöhung der Zielsequenzen aufgrund des geringen Angebots an Sondenmolekülen zu keiner Steigerung der Sensitivität führen.

Die bei einem erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Reaktionsschicht muss, um eine PCR durchzuführen, bis etwa 95°C thermisch stabil sein. Thermisch stabil soll dabei bedeuten, dass die Reaktionsschicht auch bei der genannten Temperatur derart beschaffen ist, dass sie Sondenmoleküle festhält, dass in ihr eine Hybridisierung/Denaturierung (Aufschmelzen) von Zielsequenzen und Sondenmolekülen ungehindert stattfinden kann und dass sie auch ihre sonstigen Eigenschaften im wesentlichen beibehält. Zur Immobilisierung enthält die Reaktionsschicht vorzugsweise Polymere mit Kopplungsgruppen, an die Sondenmoleküle kovalent gebunden sind. Dadurch ist sicher gewährleistet, dass Bindungspaare aus Zielsequenzen und Sondenmolekülen bei Spülvorgängen im Anschluss an eine PCR in der Reaktionsschicht zurückgehalten werden.

15 Eine besonders geeignete Reaktionsschicht besteht aus einem Hydrogel. Hydrogele bilden ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form, das einen Stoffaustausch mit einem überwiegend wässrigen Analyten erlaubt. Als besonders geeignet haben sich 20 radikalisch vernetzbare Hydrogele auf Acrylamidbasis mit Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat als Kopplungsgruppen erwiesen.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst der Flachträger des DNA-Chips eine Siliziumschicht und eine damit verbundene Isolierschicht, wobei letztere auf ihrer der Siliziumschicht abgewandten Seite die Elektrodenanordnung und die Reaktionsschicht trägt. Bei einer solchen Anordnung lässt sich die elektrische Verschaltung der Elektrodenanordnung unter Verwendung der von Si-Speicherchips bekannten Technologie 30 verwirklichen.

Ein besonderer Vorteil des vorgeschlagenen Verfahrens besteht darin, dass es bei Simultan- bzw. Multiplexuntersuchungen eine größere Vielfalt an unterschiedlichen Gestaltungsmöglichkeiten erlaubt. Dies liegt u.a. daran, dass in während der PCR entstandene Amplicons keine Markierungen eingebaut werden 35

müssen, was vor allem bei komplexen Tests die Gefahr in sich birgt, dass es zwischen den zur Markierung erforderlichen Stoffen und zwischen diesen und zu identifizierenden Zielsequenzen zu unerwünschten Wechselwirkungen kommt.

5

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen:

10

Fig. 1 eine vereinfachte perspektivische Darstellung eines einen Flachträger und ein Array von Microspots umfassenden Microchips,

15

Fig. 2 einen Querschnitt durch einen Spot entsprechend Linie II-II in Fig. 1, in vergrößerter ausschnittsweiser Darstellung,

20

Fig. 3 einen Ausschnitt einer einem Spot zugeordneten Elektrodenanordnung,

Fig. 4 eine Ausführungsform eines Microchips mit einer 4-poligen Elektrodenanordnung in einer Fig. 2 entsprechenden Darstellung,

Fig. 5 die Elektrodenanordnung des Microchips von Fig. 4 in einer Fig. 3 entsprechenden Darstellung,

Fig. 6 eine schematische Darstellung, die eine erste Verfahrensvariante einer PCR-gestützten Analyse verdeutlicht,

Fig. 7 eine die Wirkungsweise eines unspezifischen Primerpaares aufzeigende Schemazeichnung,

30

Fig. 8 eine schematische Darstellung einer Abwandlung der ersten Verfahrensvariante,

Fig. 9 eine schematische Darstellung einer zweiten Verfahrensvariante,

Fig. 10 eine schematische Darstellung einer dritten Verfahrensvariante

35

Wie Fig. 1 zeigt, umfasst ein Microchip 1 einen Flachträger 2, auf dessen einer Seite ein Spot-Array 3 aufgebracht

ist. Ein im folgenden mit Spot 4 bezeichneter Microspot enthält immobilisierte Sondenmoleküle 15, beispielsweise Oligonucleotide. Wird auf einen Spot eine Analytlösung mit unbekannten Zielmolekülen aufgebracht, so kommt es bei entsprechender Übereinstimmung in der Basensequenz zu einer Ankopplung des Zielmoleküls an das Sondenmolekül. Die durch ein solches Bindungsereignis hervorgerufene Eigenschaftsänderung, z.B. Änderungen des spezifischen Widerstandes, der Impedanz oder der Dielektrizitätskonstante, wird mit einer Elektrodenanordnung 5 erfasst.

Bei dem Ausführungsbeispiel von Fig. 2 ist eine 2-polige Elektrodenanordnung vorhanden. Diese ist beispielsweise mit Hilfe eines photolithographischen Verfahrens auf den Flachträger 2 aufgebracht. Die Elektrodenanordnung 5 umfasst zwei Elektroden 6, 7, die in Form einer Interdigitalstruktur ausgebildet sind. D.h. jede Elektrode umfasst mehrere streifenförmige parallel zueinander verlaufende Teilelektroden 6a, 7a, die sich jeweils in den Zwischenraum zweier Teilelektroden der jeweils anderen Elektrode hinein erstrecken. Die Teilelektroden 6a, 7a sind durch einen ebenfalls streifenförmigen, sich quer zu den Teilelektroden 6a, 7a streckenden Verbindungsleiter 6b, 7b miteinander verbunden. Die Elektroden 6, 7 sind mit einem hochfrequenten Wechselstrom im Megahertzbereich beaufschlagt. Die Breite 8 der Teilelektroden 6a, 7a beträgt ca. 1  $\mu\text{m}$ , ihre Höhe 9 beträgt etwa 100 bis 500 nm. Zwischen den Teilelektroden 6a, 7a ist ein Abstand 10 von ebenfalls ca. 1  $\mu\text{m}$  vorhanden.

Der Flachträger 2 umfasst eine Siliziumschicht 12 und eine zwischen dieser und den Elektroden 6, 7 angeordnete Isolierschicht 13 aus einem Polymer. Die für eine z.B. impedanzspektroskopische Messung von Bindungsereignissen erforderlichen elektrischen Verschaltungen und Bauteile sind in herkömmlicher Weise durch eine entsprechende Topologie der Siliziumschicht (nicht dargestellt) realisiert. Auf der Isolierschicht 13 ist eine Reaktionsschicht 14 aus einem Hydrogel

aufgebracht, welches weiter unten näher beschrieben wird. Es kann zweckmäßig sein, den Flachträger 2 bzw. die Siliziumschicht 13 im Bereich eines Spots mit einer Vertiefung zu versehen, welche mit der Reaktionsschicht 14 aufgefüllt ist (siehe Fig. 6, 8 - 10). In der Reaktionsschicht 14 bzw. dem Hydrogel sind Sondenmoleküle 15, was in Fig. 2 überdimensioniert und symbolisch dargestellt ist, eingebettet und homogen verteilt. Ein Sondenmolekül mit 300 Basen weist etwa eine Länge von 100 nm auf. Demzufolge hat eine unimolekulare Schicht von Sondenmolekülen bei herkömmlichen Microchips allenfalls etwa eine Dicke entsprechend der Linie 16 in Fig. 2. Es ist leicht einsehbar, dass eine solche Schicht relativ wenige Sondenmoleküle 15 aufnehmen und dementsprechend im Falle von Bindungs- bzw. Hybridisierungsereignissen das elektrische Feld der Elektrodenanordnung nur gering beeinflussen kann. Demgegenüber ist bei einem erfindungsgemäßen Microchip der Sondenmoleküle 15 enthaltende und von Feldlinien 17 durchdrungene Reaktionsbereich wesentlich erweitert und bietet Platz für eine um mehrere Zehnerpotenzen größere Anzahl von Sondenmolekülen 15. Wird auf ein solcher Art ausgestaltetes Spot-Array 3 bzw. auf einen Spot 4 eine Analytlösung 18 aufgebracht, so finden die darin enthaltenen Zielmoleküle 19 bzw. Zielsequenzen, die in Fig. 2 ebenfalls übertrieben groß und nur symbolisch dargestellt sind, eine wesentlich größere Anzahl möglicher Bindungspartner in Form der Sondenmoleküle 15 vor.

Die Reaktionsschicht 14 ist vorzugsweise so dimensioniert, bzw. weist eine derartige Dicke, beispielsweise von 5 bis 10 µm auf, dass der impedanzspektroskopische Erfassungsbereich praktisch vollständig ausgenutzt ist, was bei einer Dicke der Reaktionsschicht von etwa 5 bis 10 µm der Fall ist. Bei entsprechender Konzentration von Sondenmolekülen 15 in diesem Bereich kann somit der bindungsspezifische Messeffekt des Microchips wesentlich erhöht werden. Die Reaktionsschicht ist so beschaffen, dass sie ein wässriges Reaktionsmedium zur Verfügung stellt. Weiterhin ist sie so beschaffen, dass Zielmo-



leküle 19 oder auch andere für eine Reaktion benötigte Stoffe, beispielsweise Polymerase, in sie eindiffundieren können, ohne das dabei deren Reaktivität beeinträchtigt wird.

- 5 Wie schon oben erwähnt, wird erfindungsgemäß ein Hydrogel als Reaktionsschicht 14 verwendet. Ein Hydrogel stellt ein wässriges Milieu in mechanisch stabiler Form bei gleichzeitiger Gewährleistung des Stoffaustausches in einer überwiegend wässrigen Umgebung dar. Durch Wahl der chemischen Zusammensetzung, was die Komponenten und deren Verhältnis untereinander betrifft, können die Eigenschaften der Hydrogele, wie Wassergehalt, Quellverhalten, mechanische Stabilität, etc. über weite Bereiche variiert werden. Ein Hydrogel, das leicht herstellbar ist, und das eine gute Haftung sowohl zur Elektrodenanordnung 5 als auch zur Isolierschicht 13 aufweist, ist ein radikalisch vernetzbares Hydrogel auf Acrylamidbasis, das ein Comonomer enthält, welches eine kovalente Ankopplung entsprechend modifizierter Sondenmoleküle über Linkergruppen ermöglicht. Das Hydrogel umfasst neben der Monomervorstufe des Polyacrylamids ein Vernetzungsmittel, wenigstens einen Radikalinitiator, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls wenigstens einen Weichmacher. Nach Schichtherstellung und anschließender thermischer bzw. Fotovernetzung wird ein mit Wasser quellbares Hydrogel erhalten, das reaktive Linkergruppen zur Immobilisierung von Sondenmolekülen enthält. Als Vernetzungsmittel werden Methylenbisacrylamid und/oder Dimethylacrylsäureester, beispielsweise Tetraethylenglykoldimethacrylat eingesetzt.
- 30 Durch die Variationen der Konzentrationen des Vernetzungsmittels lässt sich die Maschenweite des Hydrogels einstellen. Das verwendete Comonomer enthält Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)-acrylat. Als Weichmacher eignet sich Mono-Di- und/oder Triethylenglykol. Die genannten Ausgangsstoffe sind mit einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, vorzugsweise mit Dimethylformamid vermennt. Durch Variation des Lösungsmittelanteiles kann die Verarbeitungsviskosität einge-

stellt werden. Die Haftung an der Flachträgeroberfläche sowie an der Elektrodenanordnung 5 kann durch Beimengung üblicher Haftvermittler beispielsweise auf Silanbasis verstärkt werden.

5

In Fig. 4 und 5 ist eine 4-polare Elektrodenanordnung 20 dargestellt. Die Elektrodenanordnung 20 setzt sich aus zwei Stromelektroden 22, 23 und zwei Spannungs- bzw. Sondenelektroden 24, 25 zusammen. Die Stromelektroden 22, 23 sind entsprechend der Elektrodenanordnung 5 des Ausführungsbeispiels nach Fig. 2 angeordnet und ausgestaltet. Die Sondenelektroden 24, 25 sind ebenfalls streifenförmig und erstrecken sich als mäanderförmiger Doppelstrang durch die zwischen den Teilelektroden 22a und 23a vorhandenen Zwischenräume hindurch. Die Stromelektroden 22, 23 sind mit einem hochfrequenten Wechselstrom beaufschlagt. An den Sondenelektroden 24, 25 liegt ein Spannungsmesser 26 an, mit dem eine Veränderung des elektrischen Wechselfeldes in Folge von Hybridisierungsereignissen detektierbar ist. Die Messung kann somit unabhängig von den Stromelektroden erfolgen, so dass sich z.B. deren die Elektrodenkapazität erhöhende Polarisierung nicht auf die Messung auswirken kann. Dagegen muss bei einer 2-poligen Elektrodenanordnung die Elektrodenkapazität durch eine entsprechend hohe, messtechnisch ungünstige Messfrequenz gering gehalten werden, um den für die Messung ausschlaggebenden Widerstand der Analytlösung bzw. der Reaktionsschicht bestimmen zu können.

Bei einer in Fig. 6 (siehe hierzu und zu Fig. 8 -10 die weiter unten wiedergegebene Legende) schematisch aufgezeigten Verfahrensvariante wird auf einen Microchip 1 eine Analyselösung 18 aufgebracht, die ein DNA-Fragment  $F_A$  mit einer Zielsequenz  $Z_A$ , ein externes Primerpaar sowie die für eine PCR erforderlichen Reagenzien, wie eine Taq-(DNA) Polymerase, dNTP's (Desoxynucleosidtriphosphate) etc. enthält. Bei der Zielsequenz  $Z_A$  handelt es sich um eine solche, die in mehreren unterschiedlichen Varianten vorkommen kann (z.B. Typisie-

5 rung von Viren, z.B. HIV oder HPV). Jeder möglichen Variante ( $Z_{A1}$ ,  $Z_{A2}$  usw.) ist mindestens ein eigener Spot 4A1, 4A2 usw. zugeordnet, wobei innerhalb der Reaktionsschicht 14 des jeweiligen Spots ein einziger Oligonucleotidtyp als Sonden-  
10 molekül immobilisiert ist, welcher mit einer spezifischen Zielsequenz hybridisieren kann. Die auf übliche Weise unter Anwendung einer Thermozyklisierung durchgeführte Amplifikation (PCR) der Zielsequenz  $Z_A$  erfolgt ausschließlich in der mobilen Phase 18. Vorzugsweise wird ein Primerpaar verwendet, das außerhalb der Zielsequenz  $Z_A$  ankoppelt (hybridisiert),  
15 wie in Fig. 7 angedeutet ist. Der kodierte Doppelstrang, also der Strang  $S^+$  und der Gegenstrang  $S^-$  lösen sich beim Denaturieren (Aufschmelzen) voneinander. Üblicherweise wird der Strang  $S^+$  („sense“ Strang) zur Identifizierung einer Zielsequenz herangezogen. Dementsprechend sind in den Spots 4A1,  
20 4A2 Oligonucleotide immobilisiert, die genau mit diesem Strang hybridisieren. Im einfachsten Fall der Anwesenheit nur eines DNA-Fragmentes  $Z_{A1}$  sammelt sich die amplifizierte Zielsequenz  $Z_{A1}$  durch Hybridisierung in jenem Spot an, in dem das  
entsprechend komplementäre Fängeroligonucleotid  $Z_{A1}$  immobilisiert ist.

25 Bei der in Fig. 8 angedeuteten Verfahrensvariante sind in der Analytlösung 18 verschiedenen Arten von DNA-Fragmenten vorhanden. Beispielhaft sind zwei solcher DNA-Fragmente,  $F_A$  und  $F_B$ , gezeigt. Bei einem oder allen der in der Analytlösung 18 vorhandenen DNA-Fragment/en kann es sich um solche gemäß der Verfahrensvariante nach Fig. 6 handeln. In diesem Fall sind  
30 unterschiedliche Gruppen von Spots vorzusehen, wobei jeder Gruppe die Typisierung der Varianten eines DNA-Fragmentes zugeordnet ist. Ziel der analytischen Untersuchung können aber auch „völlig“ unterschiedliche DNA-Fragmente sein. In diesem Fall ist es prinzipiell ausreichend, einem DNA-Fragment  $F_A$ ,  $F_B$  jeweils einen einzigen Analyse-Spot 4A, 4B zuzuordnen. Wie  
35 auch bei der Verfahrensvariante nach Fig. 6, ist hier in der Analytlösung 18 ein externes Primerpaar vorhanden. Dieses wird so ausgewählt, dass es für die Amplifikation aller zu

analysierenden DNA-Fragmente  $F_A$ ,  $F_B$  geeignet ist („Multiplex PCR“).

Die bei Fig. 6 und Fig. 8 aufgezeigten Fänger-Oligonucleotide können in weiteren Verfahrensvarianten als Primer fungieren, falls sie durch DNA-Polymerasen verlängert werden können. Es findet dann, wenn die Reaktionsschicht 18 durchlässig für die DNA-Polymerase und das/die Template/s sowie die weiteren Komponenten der PCR-Reaktion ist, eine Elongation der immobilisierten Oligonucleotide entsprechend der Sequenz der hybridisierten Matrix statt.

Bei der in Fig. 9 angedeuteten Verfahrensvariante sind mehrere verschiedene DNA-Fragmente entsprechend den Verfahrensvarianten nach Fig. 6 oder nach Fig. 8 vorhanden. Beispielhaft sind zwei solche DNA-Fragmente,  $F_A$  und  $F_B$ , gezeigt. Während bei den bisher beschriebenen Verfahrensvarianten der Analytlösung ein Primerpaar zugesetzt wurde, ist nunmehr nur ein Primer des Primerpaares mobil und gelöst in Lösung vorhanden. Dieser Primer ist unspezifisch, das heißt, es handelt sich um einen externen Primer, der bei sämtlichen in der Analytlösung vorhandenen DNA-Fragmenten  $F_A$  und  $F_B$  außerhalb der nachzuweisenden Zielsequenz  $Z_A$  und  $Z_B$  (vorzugsweise am „sense“ Strang) ankoppelt. Nach dem Denaturieren der Analytlösung diffundieren die DNA-Einzelstränge wahllos in die Spots ein. In diesen Spots sind spezifische direkt vor der Zielsequenz der Analyt-DNA bindende Oligonucleotidfänger immobilisiert. Nur dort, wo die Analyt-DNA auf komplementäre immobilisierte Oligonucleotide (Fänger) trifft, findet eine Hybridisierung statt. Im folgenden Elongationsschritt der PCR wird das 5'-Ende der Fänger-Oligonucleotide, die vorher selektiv die nachzuweisenden DNA-Fragmente eingefangen (gebunden) haben, entsprechend der Information der hybridisierten Matrize verlängert. Der Fänger wird damit zum Primer für die DNA-Polymerasereaktion.

Letzteres bedeutet, dass eine Elongation nur in einem solchen Microspot stattfinden kann, in dem auch der zur Zielsequenz

komplementäre Fänger vorhanden ist. Im Falle des Schemas in Fig. 9 heißt dies, dass der Strang  $S^+$  des DNA-Fragmentes  $F_A$  im Spot 4A und der Strang  $S^+$  des DNA-Fragmentes  $F_B$  im Spot 4B durch Elongation des jeweiligen immobilisierten Primers/Fängers kopiert wird. Beim nach dem jeweiligen Amplifikationsschritt und dem Aufschmelzen folgenden Reannealing lagern sich die ursprünglich vorhandenen und die in der Lösung neu entstandenen Zielsequenzen an komplementäre Fänger bzw. Sequenzen an. Auf Grund der Erhöhung der Konzentration der Zielsequenz durch den vorhergehenden PCR-Zyklus werden diese Sequenzen auch an noch nicht verlängerte, in ihrer ursprünglichen Form vorhandene Fängeroligonucleotide binden, so dass der nächste PCR-Elongationsschritt an diesen, durch die Hybridisierung neu entstandenen Primern ansetzt. Dadurch steigt die Konzentration an verlängertem Fänger mit jedem PCR-Zyklus. Diese Erhöhung der Konzentration an, um etwa 100-300 Basen verlängertem Fänger/Primer (gegenüber ursprünglich 20-30 Basen), ruft eine elektrische Feld- oder Widerstandsänderung hervor, die mit Hilfe der Elektrodenanordnung 5 bzw. 20 gemessen und zum PCR-Monitoring („on-line“ PCR) genutzt werden kann.

Bei der Verfahrensvariante nach Fig. 10 sind in der Analytlösung 18 eine oder mehrere DNA-Fragmentspezies entsprechend den Verfahrensvarianten nach Fig. 6 oder Fig. 8 vorhanden. Während bei den Varianten nach Fig. 6 sowie Fig. 8 Primerpaare und bei der Variante nach Fig. 9 nur ein Primer des/der Primerpaares/Primerpaare der Analytlösung zugesetzt wurden, sind hier keine gelösten freien Primer in der Lösung vorhanden. Die Elongationsreaktionen finden hier in den einzelnen Microspots 4A, 4B etc. statt. Im Gegensatz zu allen anderen Verfahrensvariante werden hier (Fig. 10) beide für den spezifischen Nachweis beider DNA-Stränge der Zielsequenz notwendigen Fänger des Fängerpaar im jeweils gleichen Gelspot immobilisiert, d.h. ein immobilisiertes internes an eine Zielsequenz hybridisierendes Fänger/Primerpaar ist vorhanden. Nach dem Aufschmelzen (Denaturieren) der Probe diffundieren die

DNA-Einzelstränge wahllos in die Spots ein. Der Strang  $S_A^+$  bzw.  $S_A^-$  hybridisiert mit seinem 5'- bzw. 3'- Ende an den komplementären Primer des Primerpaares im Spot 4A.

- 5 Gemäß Fig. 10 bindet am Spot 4A der  $S^+$ -Strang des DNA-Fragments  $F_A$  an einen mit  $A^+$  indizierten Primer sowie der  $S^-$ -Strang des DNA-Fragments  $F_A$  an einen mit  $A^-$  indizierten Primer. Es wird dann ein antiparalleler Strang  $S^-$  bzw.  $S^+$  gebildet, der nun, da er durch Elongation des immobilisierten Primers  $A^+$  bzw.  $A^-$  synthetisiert wurde, ebenfalls immobilisiert ist. Demgegenüber ist das 3'-Ende des elongierten Stranges  $S^-$  bzw.  $S^+$  frei beweglich und kann mit einem in seiner Nähe in der Reaktionsschicht immobilisierten Gegen-Primer  $A^-$  bzw.  $A^+$  hybridisieren. Beim folgenden Amplifikationsschritt ergibt sich daraus ein  $S^+$ - bzw.  $S^-$ -Strang, der, da er durch Elongation des immobilisierten Primers  $A^+$  bzw.  $A^-$  gebildet wurde, ebenfalls immobilisiert ist. Die bei jedem PCR-Zyklus auftretende Erhöhung der Konzentration an entsprechend verlängerten Fängern ruft, wie bereits weiter oben beschrieben, eine elektrische Feld- oder Widerstandsänderung hervor, die mit Hilfe der Elektrodenanordnung 5 bzw. 20 zum PCR-Monitoring (on-line PCR) genutzt werden kann.
- 10
- 15
- 20

## Legende:

- ↑ = Primer, in Lösung
- x = unspezifisch
- 5 A,B = ein bestimmtes DNA-Fragment betreffend
- └ = immobilisiertes Oligonucleotid, ohne Primerfunktion
- = immobilisierter Primer
- F = DNA-Fragment
- S = Einzelstrang eines DNA-Fragments
- 10 +/- = einen codierenden / nicht codierenden Strang betreffend

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Amplifikation und Detektion von Nucleotidsequenzen, mit folgenden Schritten:

- 5 a) es wird ein Microchip mit einem Array von mehreren Analysepositionen bildenden Microspots bereit gestellt, welche jeweils eine hydrophile Reaktionsschicht und eine darin eingebettete Mikroelektrodenanordnung umfasst, wobei diese wenigstens ein immobilisiertes, mit einer zu identifizierenden Zielsequenz eines DNA-Fragments hybridisierbares Oligonucleotid als Sondenmolekül enthält,
- 10 b) eine mehrere Zielsequenz und PCR-Reagenzien enthaltende Analytlösung wird so auf den Microchip aufgebracht, dass sie das Array vollständig überdeckt,
- 15 c) zur Amplifikation einer Zielsequenz wird das Array einer Thermozyklisierung unterworfen,
- d) Hybridisierungsereignisse an immobilisierten Sondenmolekülen einer Analyseposition werden mit Hilfe der
- 20 ihr zugeordneten Mikroelektrodenanordnung detektiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die Verwendung einer Reaktionsschicht (14) mit Kopplungsgruppen zur kovalenten Bindung von Sondenmolekülen.

25 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht (14) ein Hydrogel ist.

30 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, gekennzeichnet durch ein radikalisch vernetzbares Hydrogel auf Acrylamidbasis mit Maleinsäureanhydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat als Kopplungsgruppen.

35 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch die Verwendung eines Microchips, der eine Halbleiterschicht und eine damit verbundene Isolier-



schicht (13) umfasst, wobei letztere auf ihrer der Halbleiterschicht abgewandten Seite die Elektrodenanordnung (5) und die Reaktionsschicht (14) trägt.

5 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Halbleiterschicht eine Siliziumschicht (12) ist.

10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Analytlösung verwendet wird, die ein externes, d.h. außerhalb einer Zielfrequenz mit einem Ziel-DNA-Strang hybridisierendes Primerpaar enthält.

15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Analytlösung verwendet wird, die mehrere DNA-Fragmente mit jeweils unterschiedlichen Zielsequenzen und ein einziges zur Amplifikation sämtlicher Zielsequenzen geeignetes externes Primerpaar enthält.

20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Analytlösung verwendet wird, die einen mit dem einen Strang wenigstens eines DNA-Fragments zusammenwirkenden externen Primer enthält, und dass die Elongation eines Gegenstrangs innerhalb einer Reaktionsschicht mit Hilfe eines dort immobilisierten internen, d.h.  
25 mit der Zielsequenz spezifisch hybridisierenden Primers erfolgt.

30 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass in der Analytlösung ein mit einer Zielsequenz spezifisch hybridisierendes internes Primerpaar in einem Microspot immobilisiert ist.

## Zusammenfassung

## Verfahren zur PCR-Amplifikation und Detektion von Nucleotidsequenzen

5

10

15

Die Erfindung betrifft einen DNA-Chip mit einem Flachträger und einem darauf angeordneten Array von Sondenmolekülen (Oligonukleotide) enthaltenden Spots, wobei jedem Spot eine Mikroelektroden-Anordnung zur impedanzspektroskopischen Detektion von Bindungsereignissen zwischen den Sondenmolekülen und mittels einer Analytlösung applizierten Zielmolekülen (DNA-Fragmenten) zugeordnet ist. Zur Erhöhung der Sensitivität bzw. des bindungsspezifischen Messeffekts des Bio-Chips ist die Elektrodenanordnung zumindest teilweise in eine Sondenmoleküle enthaltende und für Zielmoleküle durchlässige hydrophile Reaktionsschicht eingebettet.

FIG 2

FIG 1

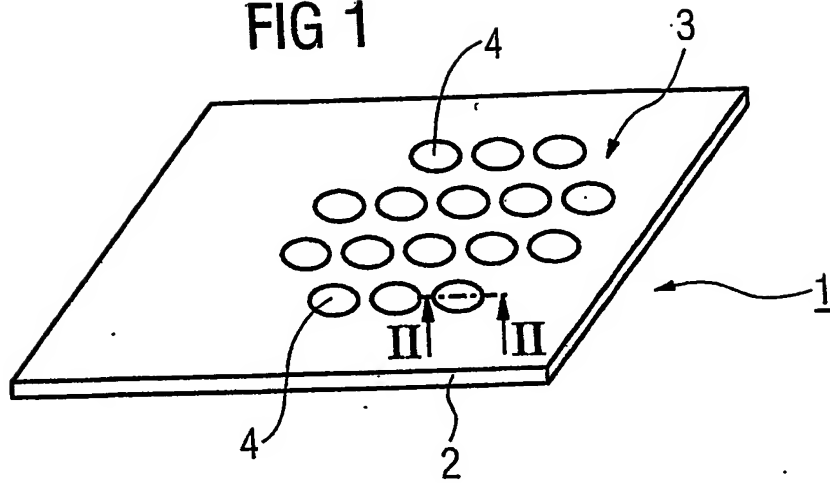


FIG 2

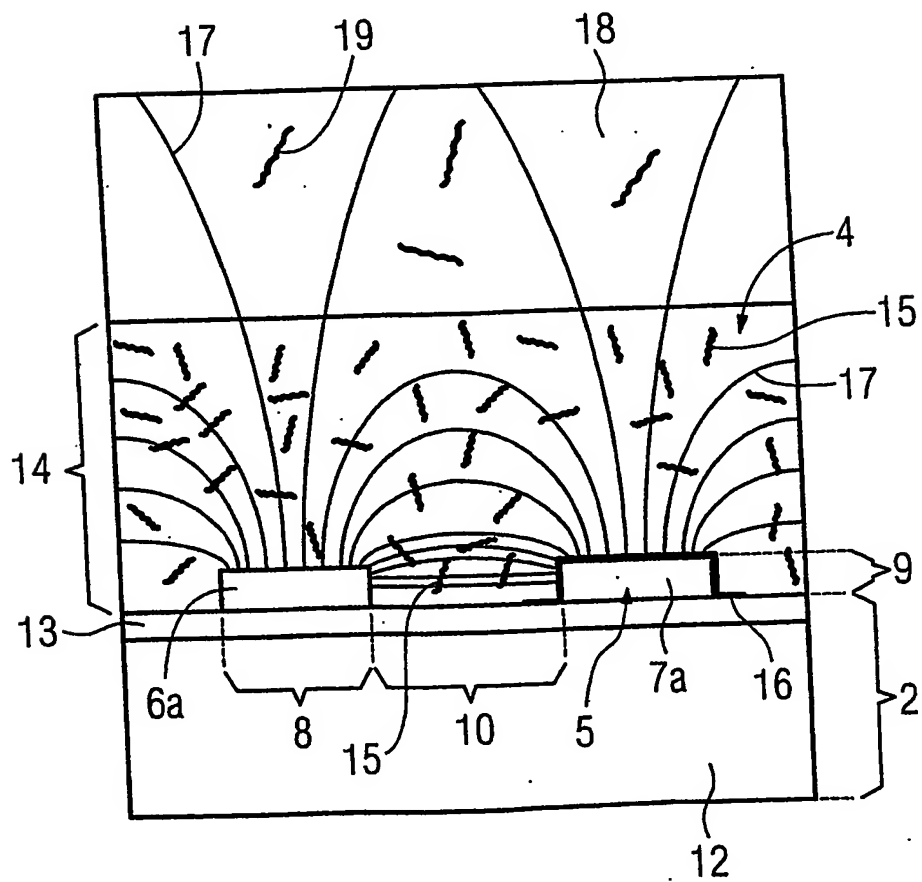


FIG 3

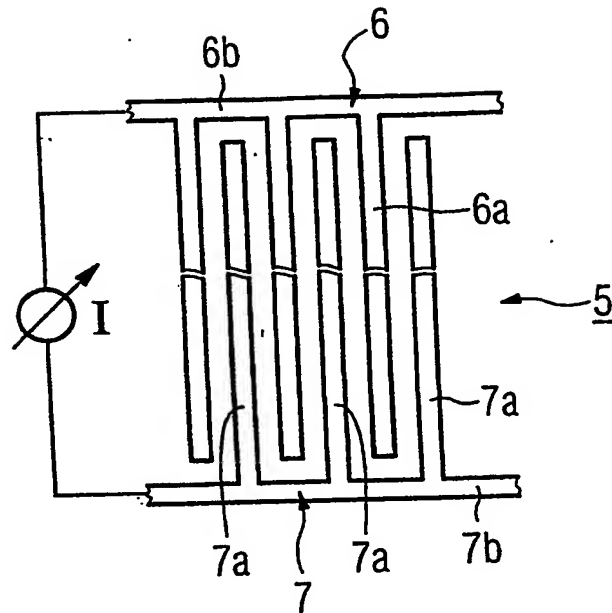


FIG 4

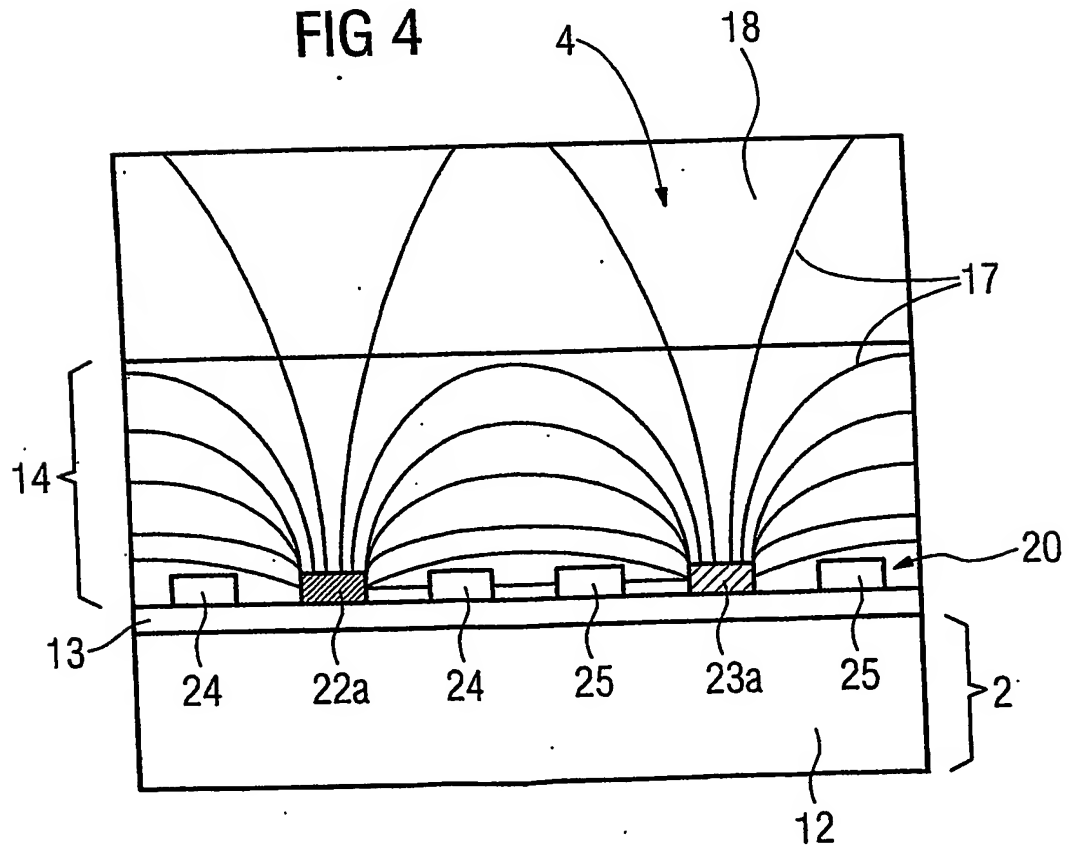
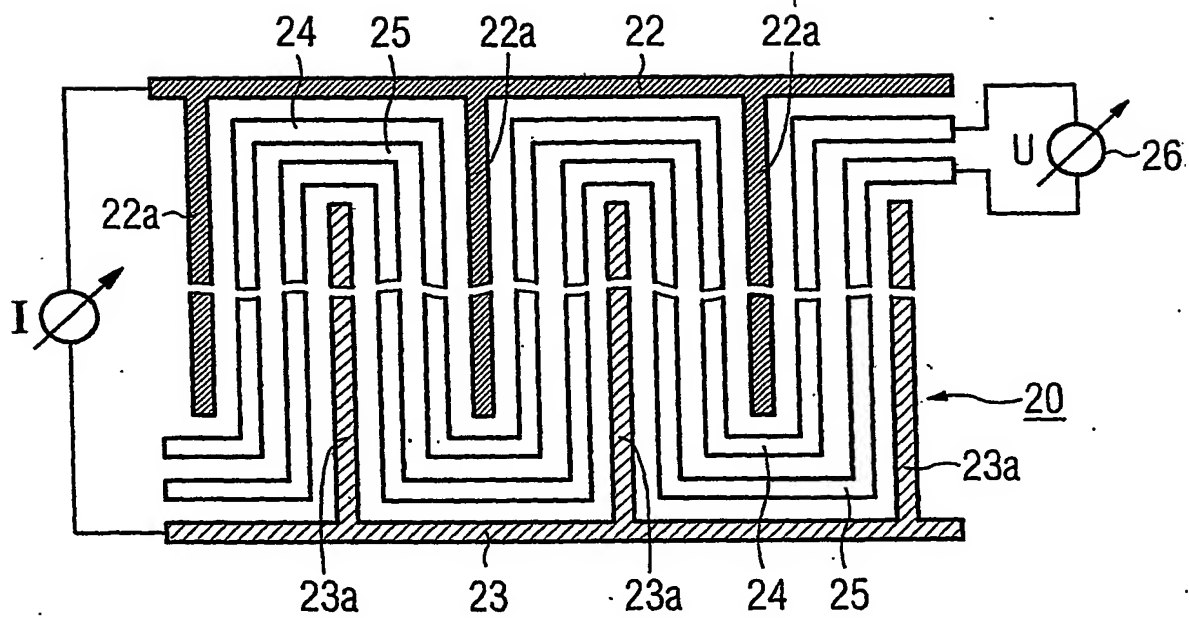
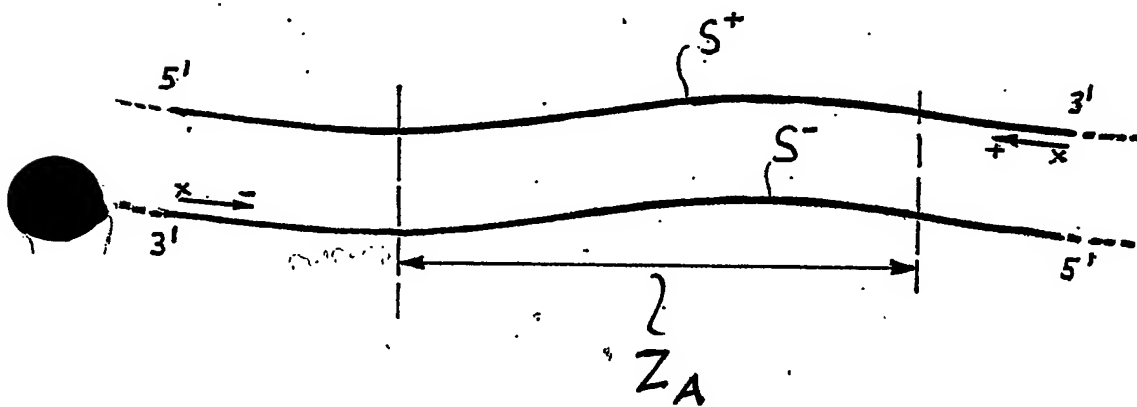
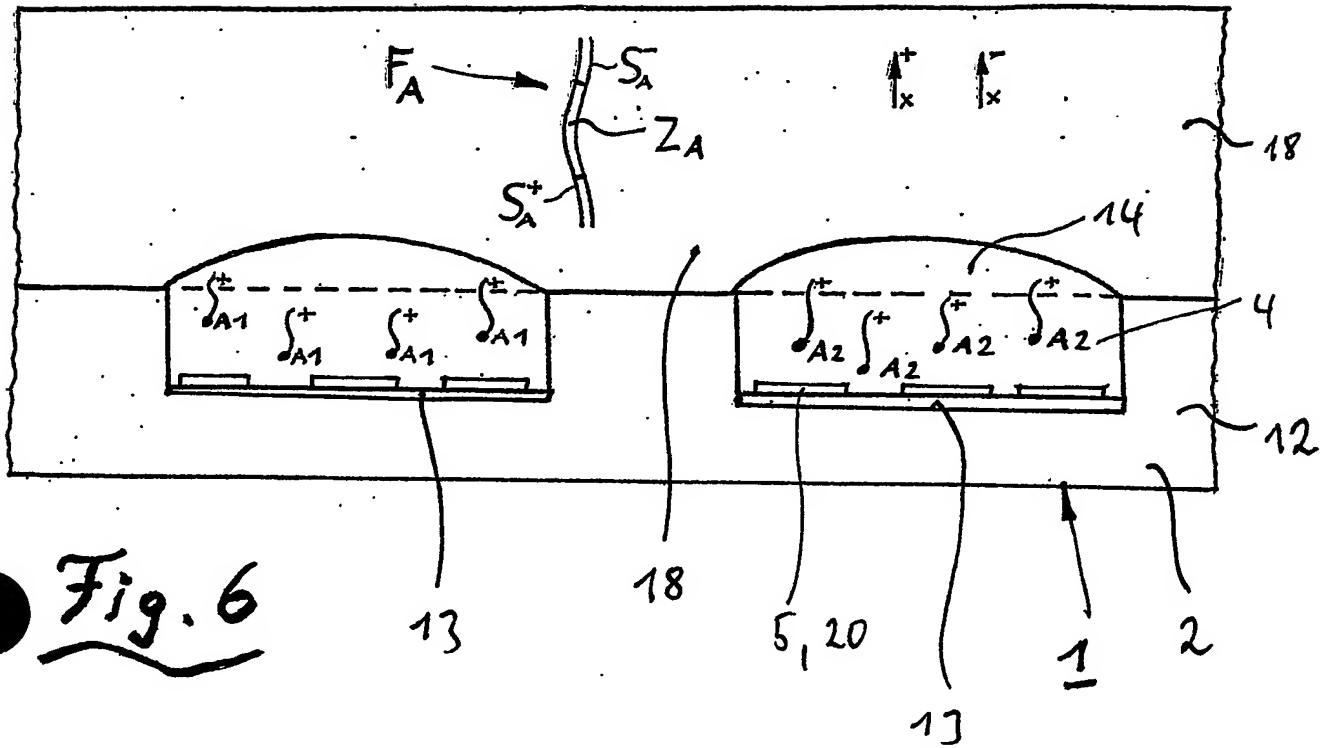
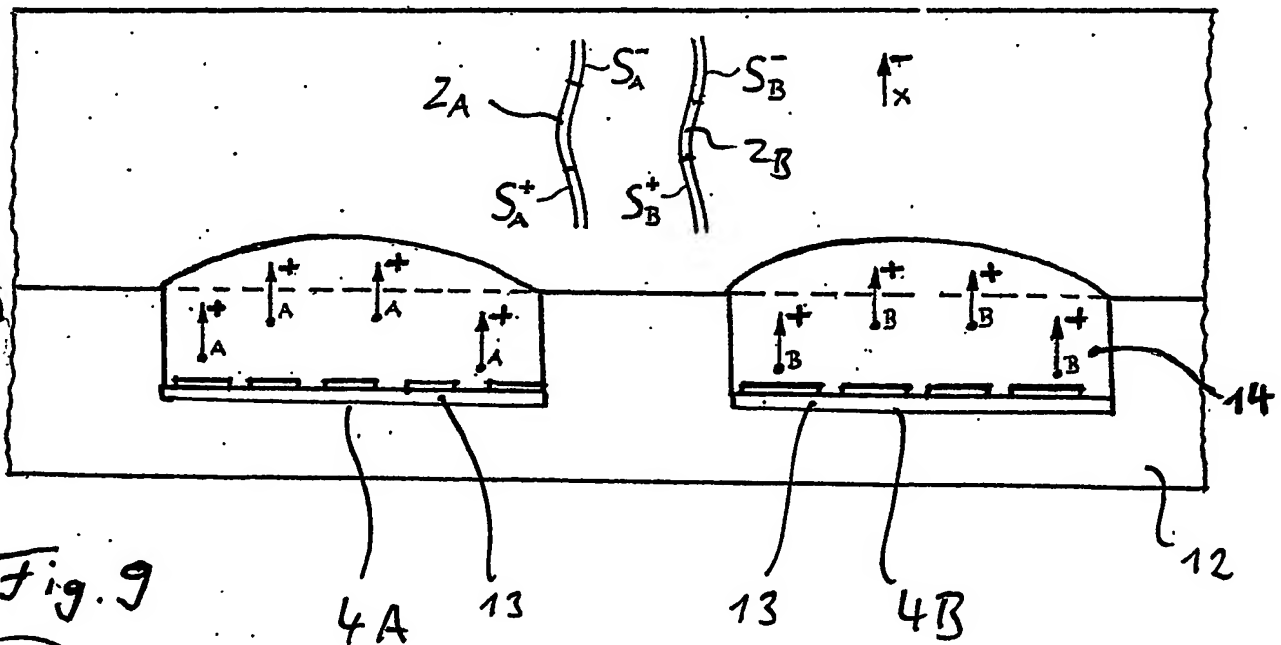
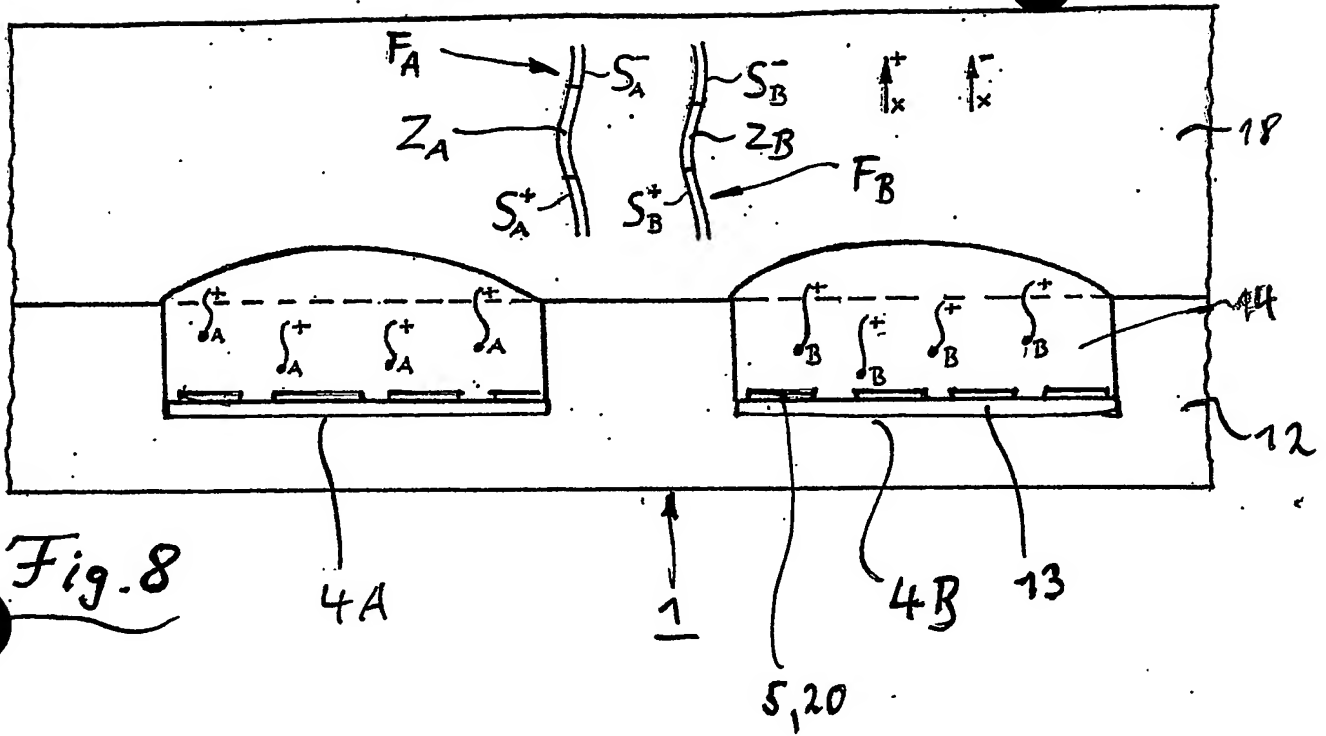
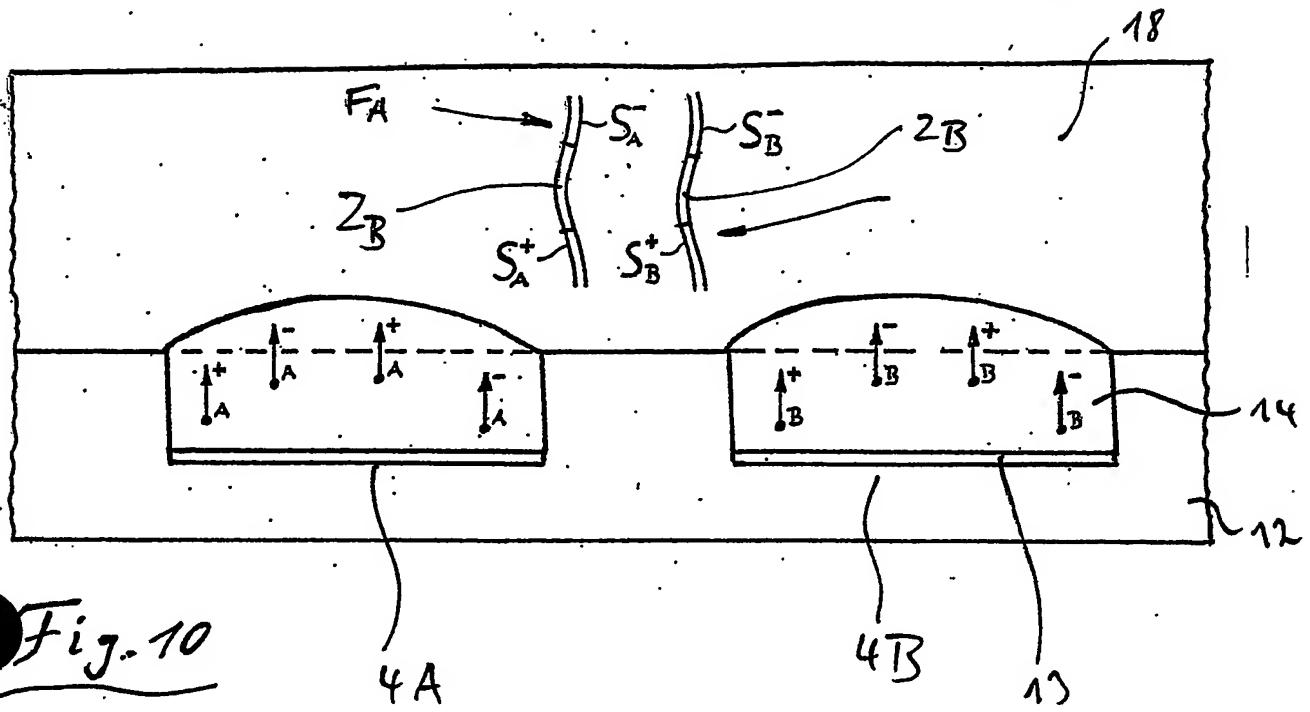


FIG 5











**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**